

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

AG

Requested Patent: EP0064012A1

Title:

DISACCHARIDES HAVING A GLUCOSAMINE AND URONIC ACID STRUCTURE,  
AND BIOLOGICAL APPLICATIONS THEREOF ;

Abstracted Patent: US4607025 ;

Publication Date: 1986-08-19 ;

Inventor(s):

PETITOU MAURICE (FR); SINAY PIERRE (FR); CHOAY JEAN (FR); LORMEAU  
JEAN-CLAUDE (FR) ;

Applicant(s): CHOAY SA (FR) ;

Application Number: US19820451615 19821220 ;

Priority Number(s): FR19810008472 19810428 ;

IPC Classification: ;

Equivalents:

AU558472, CA1263381, DE3272110D, ES8303444, FR2504535, JP3013240B,  
JP58500564T, SU1470196, US4774231, WO8203863

ABSTRACT:

1,4 alpha disaccharides of formula: with Z representing a nitrogenous functional group, M hydrogen or a sulphate or acetyl group, R an alkyl radical of 1 to 4 carbon atoms and A a functional group such as an acid group, or a derivative.

19



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

11 Numéro de publication:

**0 064 012  
A1**

12

# DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

21 Numéro de dépôt: 82400770.2

22 Date de dépôt: 28.04.82

51 Int. Cl.<sup>3</sup>: **C 07 H 15/04, C 07 H 15/20,  
A 61 K 31/70  
// C07H11/00, C07H3/04**

30 Priorité: 28.04.81 FR 8108472

43 Date de publication de la demande: 03.11.82  
Bulletin 82/44

84 Etats contractants désignés: AT BE CH DE FR GB IT LI  
LU NL SE

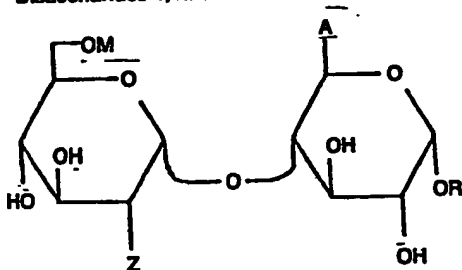
71 Demandeur: CHOAY S.A., 48, Avenue Théophile-Gautier,  
F-75782 Paris Cédex 16 (FR)

72 Inventeur: Petitou, Maurice, 27, rue du Javelot -  
Appt. 201, F-75645 Paris Cedex 13 (FR)  
Inventeur: Sinay, Pierre, 5, rue Jacques Monod,  
F-45100 Orléans (FR)  
Inventeur: Choay, Jean, 21, rue Saint-Guillaume,  
F-75007 Paris (FR)  
Inventeur: Lorneau, Jean-Claude, 1, rue Joseph  
Delattre, F-76150 Maromme (FR)

74 Mandataire: Peaucelle, Chantal et al, Cabinet  
Plasseraud 84, rue d'Amsterdam, F-75009 Paris (FR)

84 Nouveaux disaccharides formés de motifs à structure glucosamine et acide uronique, leur préparation et leurs applications biologiques.

57 Disaccharides 1,4α de formule:



avec Z représentant un groupe fonctionnel azoté, M de l'hydrogène ou un groupe sulfate ou acétyle, R un radical alcoyle de 1 à 4 atomes de carbone et A un groupement fonctionnel tel qu'un groupe acide, ou un dérivé.

**EP 0 064 012 A1**

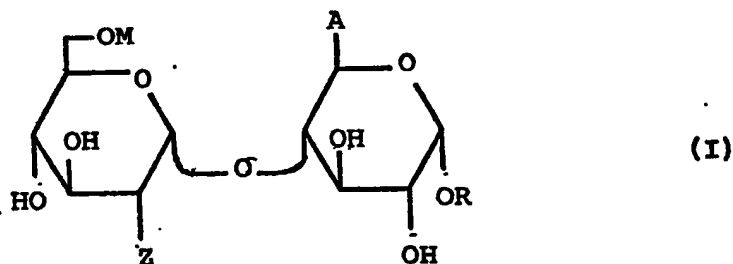
"Nouveaux disacccharides formés de motifs à structure glucosamine et acide uronique, leur préparation et leurs applications biologiques" -

L'invention est relative à de nouveaux disaccharides possédant, notamment, des propriétés biologiques, formés de motifs à structure respectivement glucosamine et acide uronique.

Elle vise, plus spécialement, des disaccharides 1,4 $\alpha$ , formés de motifs à structure D-glucosamine et acide glucuronique.

Elle vise également leur préparation ainsi que leurs applications biologiques et biochimiques, notamment en tant que principe actif de médicaments.

Ces nouveaux disaccharides répondent à la formule (I) :



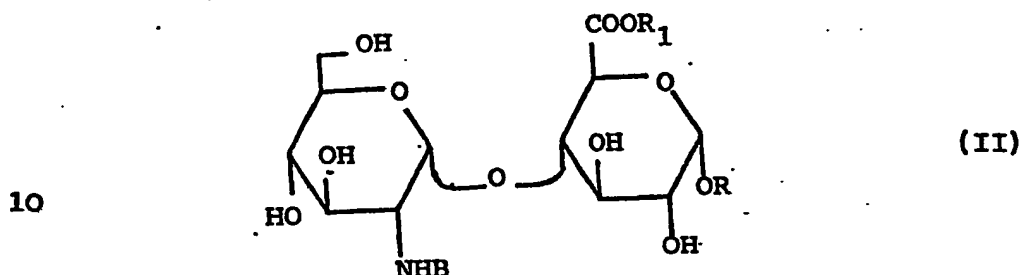
dans laquelle

- 15 - Z représente un groupe fonctionnel azoté, tel qu'un groupe azide, ou un groupe de structure -NHB dans laquelle B représente un atome d'hydrogène ou un groupe fonctionnel, tel qu'un groupe acétyle ou un groupe sulfate, éventuellement sous forme de sel avec un cation organique ou minéral, et, dans ce dernier cas,
- 20 en particulier, un cation alcalin,
- M représente un atome d'hydrogène ou un groupe -SO<sub>3</sub>M<sub>1</sub> dans lequel M<sub>1</sub> représente un cation organique ou minéral, et, dans ce dernier cas, en particulier un métal alcalin, ou représente un groupe acétyle ;
- 25 - R représente un radical alcoyle de 1 à 4 atomes de carbone, en particulier, un radical méthyle, ou encore aryle, et
- A représente un groupement fonctionnel tel qu'un groupe acide, ou un dérivé d'un tel groupe, en particulier, un groupe de structure -COOR<sub>1</sub> dans laquelle R<sub>1</sub> représente un atome d'hydrogène,
- 30 un radical alcoyle comportant de 1 à 4 atomes de carbone, en particulier un radical méthyle, ou un métal, en particulier, un métal alcalin.

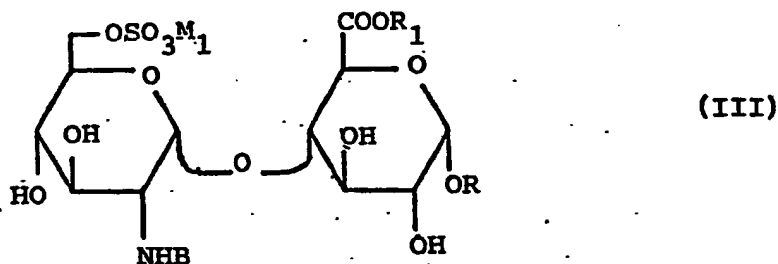
Ces disaccharides possèdent avantageusement la structure demotifs constitutifs de chaînes d'héparine. Ils comportent, en effet, sur le motif glucosamine un groupe azoté en position 2 et un groupe alcool primaire avantageusement sulfaté en position 6, et sur le motif

5 acide glucuronique un groupement fonctionnel acide ou dérivé d'un acide en position 6.

Des disaccharides préférés répondent à la formule(II) :



D'autres disaccharides spécialement préférés répondent à la formule(III) :



Dans ces formules  $B$ ,  $R$ ,  $R_1$  et  $M_1$  présentent les signifi-

15 cations données ci-dessus,  
 $M_1$  représentant avantageusement un métal alcalin, en parti-  
culier, du sodium.

Dans des familles préférées de ces disaccharides II et III, le substituant  $B$  représente un groupe acétyl. Il s'agit

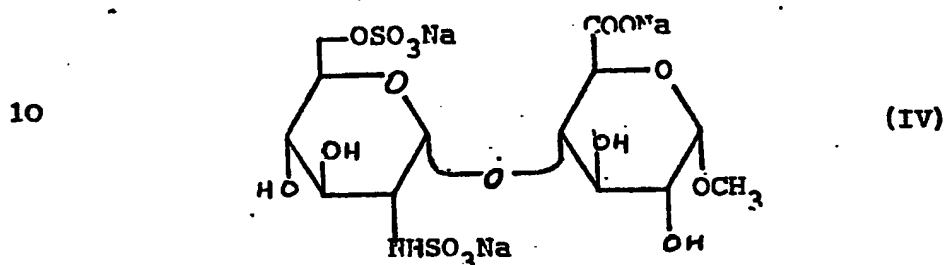
20 donc de familles comportant un motif N-acétyl D-glucosamine.  
D'autres familles de disaccharides de l'invention comportent  
comme motifs glucosamine, des N-sulfate D-glucosamine. Dans  
ces familles,  $B$  représente un groupe  $-SO_3M_2$  dans lequel  $M_2$ ,  
identique ou différent de  $M_1$ , représente un métal, en particu-

25 lier un métal alcalin, plus spécialement du sodium.

Des produits de ces familles comportent des substituants  $R_1$  et  $R$  identiques et représentant un groupe alcoyle, en particulier un groupe méthyle ou aryle.

Dans d'autres produits préférés, ces substituants sont différents et représentent respectivement un métal alcalin, en particulier, du sodium ( $R_1$ ) et un radical alcoyle, en particulier méthyle ( $R$ ).

Un produit de ce type plus spécialement préféré répond à la formule (IV) :



L'étude pharmacologique des disaccharides de l'invention a montré qu'ils possèdent, notamment, des propriétés biologiques leur permettant de contrôler, de manière spécifique, certaines étapes de la coagulation sanguine.

15 Ces produits se révèlent notamment doués d'une activité d'inhibition sélective du facteur X activé ou facteur Xa du sang, et ce, plus particulièrement en ce qui concerne les disaccharides de formule III, plus spécialement ceux comportant un motif N-sulfate D-glucosamine.

20 Ils constituent, à cet égard, des réactifs de référence permettant des mesures comparatives visant à apprécier l'activité relative d'inhibition du facteur Xa des substances à l'étude. Le disaccharide de formule IV présente, par exemple, une activité anti-Xa, mesurée selon le test de Yin-Wessler, de l'ordre de 1 000 à 2 000 u/g.

25 Le test de Yin et Wessler, qui permet de mesurer une activité représentative plus spécialement de l'aptitude de produits à potentialiser l'inhibition du facteur Xa du sang par l'antithrombine III, ou AT III, est décrit par ces auteurs dans J.Lab. Clin, Med. 1976, 81, pp 298 à 300.

30

Ces disaccharides peuvent être avantageusement utilisés en tant que principe actif de médicament pour le contrôle de la coagulation sanguine in vivo, chez l'homme ou l'animal soumis à des risques d'hypercoagulabilité, tels  
5 que ceux induits par des interventions chirurgicales, des processus athéromateux, des perturbations des mécanismes de la coagulation par des activateurs bactériens ou enzymatiques, etc., comme conséquence de la libération dans l'organisme de thromboplastines, par exemple de thrombo-  
10 plastine tissulaire.

L'intérêt de ces disaccharides est encore accru en raison de leur innocuité.

L'invention concerne donc également les compositions pharmaceutiques dans lesquelles ces composés sont associés  
15 en quantité efficace à un véhicule pharmaceutique.

Elle concerne notamment les compositions dans lesquelles le véhicule pharmaceutique est approprié pour l'administration par voie orale. Des formes d'administration de l'invention appropriées pour l'administration par  
20 voie orale peuvent être avantageusement des gélules gastro-résistantes, des comprimés ou tablettes, des pilules, ou encore présentées sous forme de liposomes.

D'autres compositions pharmaceutiques comprennent ces disaccharides en association avec les excipients  
25 appropriés pour l'administration par voie rectale. Des formes d'administration correspondantes sont constituées par des suppositoires.

D'autres formes d'administration de l'invention sont constituées par des aérosols ou des pommades.

30 L'invention concerne également des compositions pharmaceutiques injectables, stériles ou stérilisables.

Afin d'illustrer l'invention, on indique, ci-après un exemple de posologie utilisable chez l'homme : cette posologie comprend, par exemple, l'administration au patient

de 50mg à 2g de disaccharide, deux ou trois fois par jour. Ces doses peuvent être naturellement ajustées pour chaque patient en fonction des résultats et des analyses de sang effectuées auparavant, la nature des affections dont il souffre et, d'une manière générale, son état de santé.

L'invention se rapporte également à l'application des disaccharides de l'invention, à la constitution des réactifs biologiques, utilisables en laboratoires, notamment comme éléments de comparaison pour l'étude d'autres substances dont on souhaite tester l'activité anticoagulante, notamment au niveau de l'inhibition du facteur Xa.

L'invention vise également un procédé de synthèse des disaccharides définis ci-dessus.

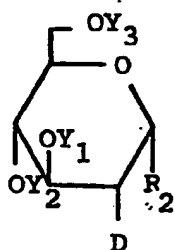
Selon ce procédé, on met en oeuvre deux monosaccharides permettant, a) de par leur structure, b) de par la nature de leurs groupements réactifs, c) de par la nature de leurs groupements de blocage, la réalisation de la stratégie de synthèse selon l'invention.

Ces groupements de blocage sont avantageusement en nombre supérieurs à 1, ils permettent d'introduire, après déblocage, des groupements fonctionnels ainsi que des groupements substitués spécifiques tels qu'existant sur la structure des disaccharides de l'invention, ils sont compatibles avec les groupements réactifs, ils sont capables de subir des déblocages séquentiels, compatibles entre eux et compatibles avec les substituants introduits à chaque étape.

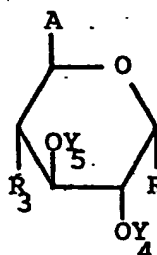
On réalise une réaction de condensation entre ces deux monosaccharides, afin d'établir la liaison 1,4  $\alpha$  recherchée dans des conditions compatibles avec les différents substituants des monosaccharides, puis on procède par étapes successives à l'introduction des groupements fonctionnels et des substituants désirés pour un disaccharide donné par mise en jeu de réactions spécifiques correspondantes.



Les monosaccharides mis en oeuvre répondent respectivement aux formules V et VI :



(V)



(VI)

- 5 Dans ces formules,  $R_2$  et  $R_3$  représentent deux groupements réactifs autorisant l'établissement, sélectivement, d'une liaison 1,4, ces groupements étant choisis parmi ceux compatibles avec les autres groupements des monosaccharides ;
- 10 -  $Y_1$  à  $Y_5$  représentent des groupements de blocage permettant, de par leur nature, d'introduire successivement les groupements fonctionnels désirés sans que les groupements de blocage restant ne soient affectés, et
- 15 - D représente un groupement azoté précurseur d'un groupe - ment fonctionnel azoté -NHB tel que défini ci-dessus, de préférence un groupe azide ;

- A et R présentent les significations données ci-dessus, A représentant plus spécialement un groupe  $\text{-COOR}_1$  avec  $\text{R}_1$  représentant un radical alcoyle ou tout autre radical pouvant être éliminé pour donner lieu à un groupe  $\text{-COOM}_1$  tel que défini ci-dessus.

Selon une disposition de grand intérêt de l'invention, le groupement de blocage  $\text{Y}_3$ , qui occupe une position destinée à être sulfatée, est constitué par un groupement permettant de réaliser sélectivement l'opération de sulfatation sans affecter les autres groupements. De manière préférée,  $\text{Y}_3$  représente un groupe acétyle. Le choix d'un groupement de ce type, plus spécialement d'un groupement acétyle, sera également effectué, en cours de synthèse, pour d'autres positions destinées à être sulfatées, à savoir pour B dans  $\text{-NHB}$ .

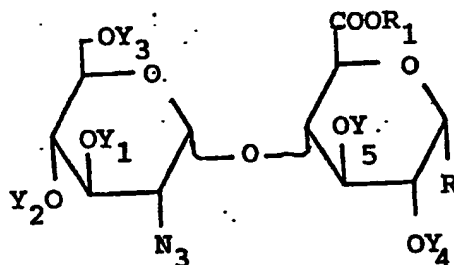
Conformément à une autre disposition, les groupements de blocage  $\text{Y}_1$ ,  $\text{Y}_2$ ,  $\text{Y}_4$  et  $\text{Y}_5$  qui seront éliminés en cours de synthèse pour libérer des groupes hydroxyle sont constitués par des groupes benzyle.

Dans un mode préféré de réalisation de l'invention, la réaction de condensation des monosaccharides V et VI est basée sur la réaction d'un halogénure avec une fonction alcool.

On met alors avantageusement en oeuvre un monosaccharide V dans lequel  $\text{R}_2$  représente un halogénure, de préférence un bromure, ou encore un chlorure, avec un monosaccharide VI dans lequel  $\text{R}_3$  représente un groupe hydroxyle.

Cette réaction est avantageusement réalisée en milieu solvant, en particulier dans un solvant organique du type du dichlorométhane. On utilise avantageusement un catalyseur, tel que du triflate d'argent et également un accepteur de protons tel que de la sym-collidine.

On traite ensuite le disaccharide à liaison 1,4 $\alpha$  obtenu, de structure :



(VII)

de manière à introduire sélectivement et successivement les groupements fonctionnels désirés.

- 5 Afin d'introduire un groupe sulfate à la place de  $Y_3$ , on soumet tout d'abord le disaccharide VII à une réaction d'hydrolyse sous l'action d'une base forte telle que de la soude, puis à l'action d'un agent d'alcoylation afin de maintenir comme substituant A, un groupe  $-\text{COOR}_1$ .

- 10 Le disaccharide obtenu, qui comporte ainsi une fonction alcool primaire  $-\text{CH}_2\text{OH}$  en position 6 du motif D-glucosamine, est soumis à l'action d'un agent de sulfatation dans des conditions permettant de remplacer le groupe  $-\text{CH}_2\text{OH}$  en position 6 par un groupe sulfate sans affecter les autres groupes de blocage de la molécule
- 15 ainsi que le groupe azide. On utilise avantageusement, à cet effet, un complexe de triméthylamine et de  $\text{SO}_3$ . L'introduction du cation  $\text{M}_1$  désiré peut être notamment réalisée à l'aide d'une résine échangeuse d'ions comprenant ce cation, ou encore, après passage sous forme acide, par neutralisa-
- 20 tion avec la base du cation.

Au cours d'une étape suivante, on procède alors avantageusement à la libération des groupes  $-\text{OH}$  bloqués par  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_4$  et  $Y_5$  et à la transformation du groupe  $-\text{N}_3$  en groupe  $-\text{NH}_2$ .

- 25 A cet effet, il est approprié de recourir à une

réaction d'hydrogénation, avec de l'hydrogène en présence d'un catalyseur, en opérant dans des conditions compatibles avec le maintien du groupement sulfate en position 6 du motif D-glucosamine.

5 Selon une variante de réalisation de l'invention, on prépare un disaccharide comportant un motif N-acétyl D-glucosamine en traitant le disaccharide précédemment obtenu avec un agent d'acétylation, en particulier de l'anhydride acétique.

10 On opère avantageusement en milieu faiblement basique, à un pH de l'ordre de 8 dans des conditions n'affectant pas les autres substituants du disaccharide.

Selon une autre variante de réalisation de l'invention, on prépare un disaccharide comportant un motif N-sulfate  
15 D-glucosamine en traitant le disaccharide obtenu après l'étape d'hydrogénation avec un agent de sulfatation.

Il apparaît approprié d'effectuer cette réaction à pH basique entre 9 et 10 environ, avantageusement à l'aide d'un complexe de triméthylamine et de  $\text{SO}_3$ . Pour obtenir ce  
20 groupe sulfate, sous forme de sel, on utilise avantageusement une résine échangeuse d'ions contenant le cation que l'on souhaite introduire, ou encore, après passage sous forme acide, on neutralise avec la base du cation.

Le traitement des produits N-acétylé ou N-sulfatés évoqués  
25 ci-dessus par un hydroxyde métallique permet d'obtenir, si souhaité, les disaccharides correspondant comportant un groupe carboxylate en position 6 du motif glucuronique. On utilise avantageusement de la soude pour former du carboxylate de sodium.

30 Les disaccharides intermédiaires sont des produits nouveaux et en tant que tels entrent également dans le cadre de l'invention. Il en est de même du monosaccharide (2) décrit dans les exemples.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans la description des exemples qui suivent et en ce se reportant aux figures dans lesquelles

- les figures 1 et 2 représentent l'ensemble du schéma réactionnel correspondant aux synthèses décrites dans les exemples, et
- les figures 3 et 4 les spectres RMN de disaccharides de l'invention.

Les abréviations utilisées dans les formules présentent les significations suivantes :

Ac représente un groupe acétyle,

Bn un groupe benzyle et

Me un groupe méthyle.

Les composés des figures 1 et 2 sont identifiés par des références numériques entre parenthèses, qui sont également utilisées dans les exemples pour les désigner.

EXEMPLE 1 : Préparation du (méthyl 2,3- di-O-benzyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside) uronate de méthyle.

Dans 20 ml de chlorure de méthylène, on soumet à agitation pendant une nuit dans l'obscurité, un mélange de 0,75 g (2 mmole) de 2,3-di-O-benzyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside de méthyle, 20 mg (0,08 mmole) de diméthyl-aminopyridine, 0,6 ml (4mmole) de triéthylamine et 0,84 g (3mmole) de chlorure de trityle.

Une chromatographie en couche mince (méthanol/chloroforme : 0,2/20, v/v) montre que la réaction est complète (le monosaccharide de départ est préparé selon la méthode de Freudenberg K. et Plankenhorn E, décrite dans Ber. Deut. Chem. Ges. 73 (1940) 621-631.

On ajoute successivement à ce mélange 0,6 ml (4 mmole) de triéthylamine, 0,35 ml (3mmole) de chlorure de benzoyle, 50 mg (0,20 mmole) de diméthylaminopyridine et on prolonge l'agitation pendant deux jours.

Pour éliminer le groupement trityle, on ajoute au mélange une solution de 0,5M d'acide paratoluène sulfonique dans du méthanol (20 ml).

- Au bout d'une heure, on dilue le mélange avec du chlorure de méthylène, puis on lave avec de l'eau jusqu'à neutralité. On purifie le produit par chromatographie sur colonne (40 g) en utilisant un mélange éther-hexane (3/1, v/v).
- 5 On obtient une mousse blanche pure (0,84 g ; 87,7%) qu'on oxyde immédiatement selon la méthode de Kovac P., Alföldi J., Kosik M. décrite dans Chem. Zvesti 28 (1974 820-832).
- 10 On dissout 480 mg (1mmole) du produit dans 8ml d'acétone et on ajoute à 0°C à la solution refroidie, sous agitation, une solution d'oxyde de chrome VI dans de l'acide sulfurique 3,5 M (1,15ml de la solution de chrome contient 1,17 g dans 5 ml).
- 15 On laisse le mélange se réchauffer à température ambiante, puis au bout de deux heures on ajoute de la glace et de l'eau et on extrait le produit avec du chloroforme. La phase chloroformique est lavée avec de l'eau et le solvant séché est évaporé.
- 20 On dissout la mousse obtenue dans du méthanol (10 mg/ml) et on ajoute de la soude (5ml d'une solution 3M). Après trois heures, on lave la phase aqueuse deux fois avec de l'éther puis on l'acidifie avec de l'acide chlorhydrique. On extrait alors le produit avec de l'éther. On
- 25 lave la phase organique avec de l'eau, on la sèche et on la concentre. La solution ainsi obtenue est méthylée avec du diazométhane dans de l'éther et purifié sur une colonne de gel de silice (15 g) dans un mélange éther-hexane (2/1) ; v/v).
- 30 Rendement : 233 mg, : 57,9 %.
- Le composé est cristallisé dans un mélange hexane-éther et présente les caractéristiques suivantes :
- P.F. : 82°C ;
- $[\alpha]_D^{20}$  : +17,5 (c = 1 ; chloroforme) ;
- 35 Spectre  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{Me}_4\text{Si}$  ; référence interne)  $\delta$  2,9 (d, 1H, OH) 3,35 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ) 3,69 (s, 3H,  $\text{COOCH}_3$ ) 7,27 (12 H, 2 Ph).

Analyse : calculé pour  $C_{22}H_{26}O_7$  : C, 65,65 ; H, 6,51 ;  
trouvé : C, 65,53 ; H, 6,29).

EXEMPLE 2 : Préparation du disaccharide (3)

La synthèse de ce disaccharide (3) est réalisée à partir  
des monosaccharides (1) et (2) en opérant comme suit.  
On effectue la réaction à 0°C sous azote et à l'abri  
de la lumière.

A une solution du composé (2) (40mg) dans le dichlorométhane  
sec (2ml), on ajoute successivement du composé (1) (98mg)  
de la sym-collidine (35  $\mu$ l) et du triflate d'argent (56,5  
mg). Après une heure trente, le mélange réactionnel est  
dilué par du dichlorométhane (50 ml). La solution est  
filtrée, lavée avec du bicarbonate de sodium saturé (deux  
fois 20 ml), puis avec de l'eau et enfin séchée.

Le sirop obtenu après concentration est chromatographié sur  
gel de silice (15 g) dans le système acétate d'éthyle/hexane  
(1,3, v/v).

On obtient ainsi le disaccharide (3) (60,2 mg ; 74%).

Le spectre de RMN confirme la structure recherchée :  
signaux observés (par rapport à  $Me_4Si$ , standard interne),  
 $\delta$  1,95 (s, 3H,  $-OCOCH_3$ ) 3,34 (s, 3H,  $OCH_3$ ) 3,68 (s, 3H,  $CO-O-$   
 $CH_3$ ) 5,53 (d, 1H, 3,5 Hz, H'-1) 7,20-7,40 (m, 20 H, 4 Ph).

EXEMPLE 3: Préparation du disaccharide (6)

Dans une première étape a), on effectue une saponification  
du groupement -OAC en position 6 du motif D-glucosamine,  
puis on procède dans une étape b) à la sulfatation du groupe  
-OH en position 6, et au cours d'une étape c) d'hydrogénation  
on élimine les groupements Bn de blocage et on transforme  
simultanément le groupe  $-N_3$  en groupe  $-NH_2$ .

a - préparation du disaccharide (4) par saponification -

On dissout le composé (3) dans du méthanol (10 ml), puis  
on ajoute de la soude 1 N (2 ml). Après trois heures, la  
solution est neutralisée par passage sur une résine Dowex  
50 W x 4  $H^+$  (5ml). Après concentration, le résidu est  
méthylé par du diazométhane, afin de réintroduire le groupe  
méthyle éliminé en même temps que l'acétate. on obtient,  
ainsi le composé (4).

b - préparation du disaccharide (5) par sulfatation -

Le composé (4) est dissous dans du DMF anhydre (3ml)  
On ajoute ensuite le complexe triméthylamine/ $\text{SO}_3$  (20mg) et  
on laisse à 65°C. Après une nuit, le mélange est évaporé à  
5 sec, repris par du chloroforme, dilué avec du méthanol, puis  
passé sur une colonne de résine DOWEX 50- $\text{Na}^+$ . La phase orga-  
nique est lavée à l'eau, séchée, puis le chloroforme est  
évaporé. On obtient le composé (5) (40 mg).

c - préparation du disaccharide (6) par hydrogénation -

10 Le composé (5) est dissous dans du méthanol (10 ml) et  
de l'eau (1ml). On ajoute 40 mg de Pd/C à 5% et on soumet à  
l'action de l'hydrogène pendant 48 heures. Après filtration  
et évaporation, on obtient le composé (6) (29 mg).

EXEMPLE 4 - Préparation des disaccharides (7) et (8) -

15 On prépare ces dérivés en soumettant le disaccharide (6) à  
une réaction d'acétylation du groupe  $-\text{NH}_2$  du motif à  
structure glucosamine, suivie d'une saponification  
du groupe  $-\text{COOMe}$  du motif à structure acide uronique.  
Le composé (6) (14 mg) est dissous dans du méthanol (3ml)  
20 Le pH est ajusté à 8 avec de la soude 1N. On ajoute  
alors de l'anhydride acétique (100  $\mu\text{l}$ ). Après 30 minutes,  
on évapore à sec. Le résidu est dissous dans de l'eau  
(1,5 ml) et de la soude 1 N est ajoutée (0,5ml). Après  
une nuit à température ambiante, la solution est neutralisée  
25 à l'aide d'acide chlorhydrique. Le produit est ensuite  
dessalé par passage sur une colonne de Séphadex G-25  
(1,8 x 20 cm). Les fractions contenant le produit sont  
rassemblées et chromatographiées sur une résine échangeuse  
d'anions (AG 1 x 2 200-400 mesh ; lit de 1 ml). Les produits  
30 sont élués à l'aide d'un gradient de chlorure de sodium  
(0  $\rightarrow$  3M). Après regroupement des fractions contenant le  
composé (8), celui-ci est dessalé par passage sur la  
colonne de Séphadex G-25 utilisée ci-dessus. m = 3,4 mg.



La structure du composé (8) est confirmée par dosage de l'acide uronique, de la glucosamine et des sulfates et par son spectre RMN (voir figure 3) (Les significations des symboles utilisés sur cette figure sont les suivantes.

5 G désigne le signal du carbone anomère en 1 de l'acide uronique et Aa-1 celui de la N-acétyl glucosamine ; Aa-6 celui du groupe O-sulfate en position 6 de la glucosamine sulfatée; A-a2 celui du carbone en position 2 du motif glucosamine ; OMe, celui du groupe méthylglucoside et MeOH, celui du méthanol servant  
10 de standard interne). Son spectre U.V. présente un maximum d'absorption à 205 nm.

EXEMPLE 5.: Préparation des disaccharides (9) et (10) -

15 Pour obtenir ces dérivés, on soumet tout d'abord le disaccharide (6) à une réaction de sulfatation pour transformer le groupe  $\text{-NH}_2$  en groupe  $\text{-NHSO}_3\text{Na}$ , puis à une réaction desaponification du groupe  $\text{-COOMe}$  comme indiqué ci-dessus.

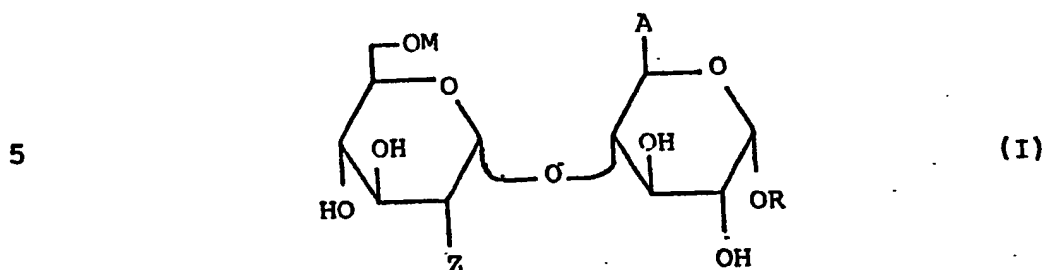
20 Le produit (6) (14mg) est dissous dans l'eau (5ml). Le pH est amené et maintenu à 9,5 à l'aide d'addition, contrôlée automatiquement, de soude 0,1N. On ajoute du complexe triméthylamine/ $\text{SO}_3$  (20 mg). Après une nuit, on procède à une nouvelle addition de complexe (30 mg).

25 Après 24 heures, on ajoute de la soude 1N (1ml) et on laisse 1 heure à température ambiante. Après passage sur résine échangeuse de cations (Dowex 50 W  $\text{H}^+$ ), puis neutralisation par la soude, le composé (10) est purifié comme décrit pour le composé (8) (dessalage, échange d'ions, dessalage). On obtient ainsi 2,9 mg du produit (10).

30 La structure du produit 10 est confirmée par dosage de l'acide uronique, de la glucosamine et des sulfates ainsi que par son spectre RMN (voir figure 4). Sur cette figure, G, OMe, MeOH présentent les significations utilisées pour la  
35 figure 3, As-1 représente le signal du carbone anomère en position 1 de la glucosamine N-sulfatée, As-6 celui du carbone en position 6 de la glucosamine sulfatée et As-2 celui du carbone anomère de la glucosamine N-sulfatée en position 2.

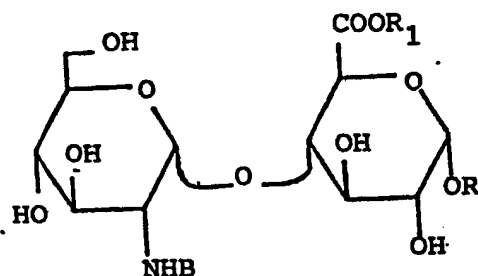
REVENDICATIONS

1. Disaccharides 1,4' formés de motifs à structure D-glucosamine et acide glucuronique, caractérisés en ce qu'ils répondent à la formule (I) :



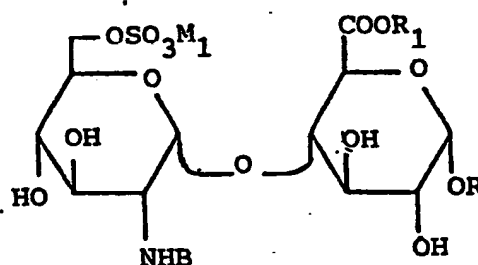
dans laquelle :

- Z représente un groupe fonctionnel azoté tel qu'un groupe azide ou un groupe de structure  $\sim\text{NHB}$  dans laquelle B représente un atome d'hydrogène ou un groupe fonctionnel
- 1 C tel qu'un groupe acétyle ou un groupe sulfate éventuellement sous forme de sel avec un cation organique ou minéral, et, dans ce dernier cas, en particulier un cation alcalin,
- M représente un atome d'hydrogène ou un groupe  $\sim\text{SO}_3\text{M}_1$  dans lequel M<sub>1</sub> représente un cation organique ou minéral,
- 15 et, dans ce dernier cas, en particulier un métal alcalin, ou représente un groupe acétyle ;
- R représente un radical alcoyle de 1 à 4 atomes de carbone, en particulier, un radical méthyle, ou encore aryle, et
- A représente un groupement fonctionnel tel qu'un groupe
- 20 acide, ou un dérivé d'un tel groupe, en particulier, un groupe de structure  $\sim\text{COOR}_1$  dans laquelle R<sub>1</sub> représente un atome d'hydrogène, un radical alcoyle comportant de 1 à 4 atomes de carbone, en particulier, un radical méthyle, ou un métal, en particulier, un métal alcalin.
- 25 2. Disaccharides selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils répondent à la formule II :



(II)

ou à la formule III :



(III)

dans lesquelles,  $\underline{B}$ ,  $\underline{R}$ ,  $\underline{R}_1$  et  $\underline{M}_1$  présentent les significations données ci-dessus,

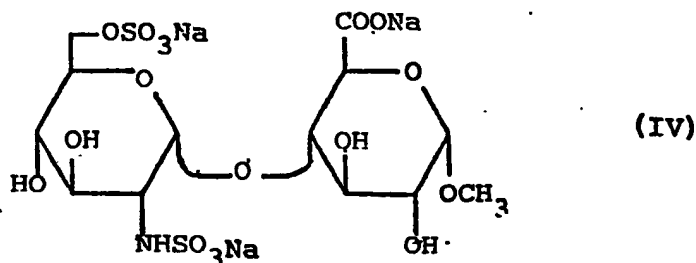
$\underline{M}_1$  représentant avantageusement un métal alcalin, en particulier, du sodium.

3. Disaccharides selon la revendication 2, caractérisé en ce que  $\underline{B}$  représente un groupe acétyle.

10 4. Disaccharides selon la revendication 2, caractérisés en ce que  $\underline{B}$  représente un groupe  $-\text{SO}_3\text{M}_2$  dans lequel  $\underline{M}_2$ , identique ou différent de  $\underline{M}_1$  défini ci-dessus, représente un métal alcalin, en particulier du sodium.

5. Disaccharides selon la revendication 3 ou 4, caractérisés en ce que  $\underline{R}_1$  et  $\underline{R}_2$  sont identiques et représentent un groupe alcoyle, en particulier méthyle ou bien  
15  $\underline{R}_1$  et  $\underline{R}_2$  sont différents,  $\underline{R}_1$  représentant un métal alcalin, en particulier du sodium et  $\underline{R}$  un radical alcoyle en particulier méthyle.

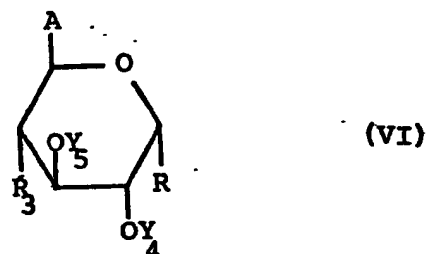
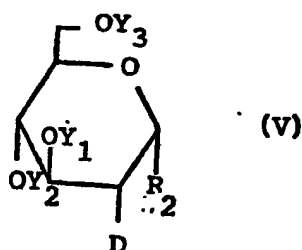
20 6. Disaccharide caractérisé en ce qu'il répond à la formule IV :



ce disaccharide présentant une activité anti-Xa (Yin-Wessler) de 1000 à 2000 u/g.

7. Médicaments, caractérisés en ce qu'ils
- 5 comprennent une quantité efficace d'au moins un disaccharide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.
8. Procédé de préparation de disaccharides selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'
  - on met en oeuvre deux monosaccharides permettant
  - 10 a) de par leur structure, b) de par la nature de leurs groupements réactifs, c) de par la nature de leurs groupements de blocage, la réalisation de la stratégie de synthèse selon l'invention, des groupements de blocage, avantageusement en nombre supérieurs à 1, permettant d'introduire, après déblocage, des groupements fonctionnels ainsi
  - 15 que des groupements substitués spécifiques tels qu'existant sur la structure des disaccharides de l'invention, ils sont compatibles avec les groupements réactifs, et étant capables de subir des déblocages séquentiels, compatibles entre eux
  - 20 et compatibles avec les substituants introduits à chaque étape,
  - on réalise une réaction de condensation entre ces deux monosaccharides afin d'établir la liaison 1,4  $\alpha$  recherchée, dans des conditions compatibles avec les
  - 25 différents substituants des monosaccharides, puis on procède par étapes successives à l'introduction des groupements fonctionnels désirés pour un disaccharide donné par mise en jeu de réactions spécifiques correspondantes.

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que les monosaccharides mis en oeuvre répondent respectivement aux formules V et VI :

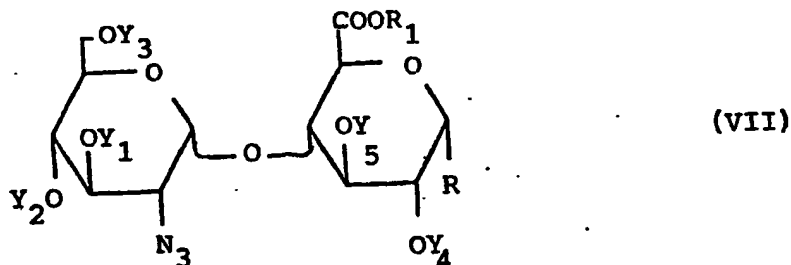


5 dans lesquelles  $R_2$  et  $R_3$  représentent deux groupements réactifs autorisant l'établissement, sélectivement, d'une liaison 1,4', ces groupements étant choisis parmi ceux compatibles avec les autres groupements des monosaccharides ;

10 -  $Y_1$  à  $Y_5$  représentent des groupements de blocage permettant de par leur nature d'introduire successivement les groupements fonctionnels désirés sans que les groupements de blocage restant ne soient affectés, et

15 - D représente un groupement azoté précurseur d'un groupement fonctionnel azoté  $-NHB$  tel que défini ci-dessus, de préférence un groupe azide ;

- A et R présentent les significations données ci-dessus, A représentant plus spécialement un groupe  $-COOR_1$  avec  $R_1$  représentant un radical alcoyle, ce qui  
20 conduit à un disaccharide de formule VII :



10. Procédé selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce que  $Y_3$  est constitué par un groupement

permettant d'introduire ultérieurement, dans cette position, un groupe sulfate et représente plus particulièrement un groupe acétyle.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 5 8 à 10, caractérisé en ce que les groupements de blocage  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_4$  et  $Y_5$  qui seront éliminés en cours de synthèse pour libérer des groupes hydroxyle, sont constitués par des groupes benzyle.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendica- 10 tions 8 à 11, caractérisés en ce que  $R_2$  représente un halogénure, de préférence un bromure, ou encore un chlorure, et  $R_3$  un groupe alcool.

13. Procédé selon l'une quelconque des 15 revendications 8 à 12, caractérisé en ce qu'on soumet tout d'abord le disaccharide VII à une réaction d'hydrolyse sous l'action d'une base forte telle que de la soude puis à l'action d'un agent d'alcoylation afin de maintenir comme substituant A, un groupe  $-COOR_1$ , qu'on soumet, le 20 cas échéant, le disaccharide obtenu, comportant une fonction alcool primaire  $-CH_2OH$  en position 6 du motif D-glucosamine, à l'action d'un agent de sulfatation dans des conditions permettant de remplacer le groupe  $-CH_2OH$  en position 6 par un groupe sulfate sans affecter les autres groupes de blocage de la molécule ainsi que le groupe azide , 25 un complexe de triméthylamine et de  $SO_3$  étant avantageusement utilisé pour introduire un groupe  $-SO_3Na$ , qu'on effectue ensuite, le cas échéant, une réaction d'hydrogénation pour libérer les groupes  $-OH$  bloqués par  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_4$  et  $Y_5$  et transformer le groupe  $-N_3$  en groupe  $-NH_2$  et que (si on le 30 désire), pour préparer un disaccharide comportant un motif N-acétyl D-glucosamine on traite le disaccharide précédemment obtenu avec un agent d'acétylation, en particulier de l'anhydride acétique, et pour préparer un disaccharide comportant

un motif N-sulfate D-glucosamine, on traite le disaccharide obtenu après l'étape d'hydrogénation avec un agent de sulfatation, ces réactions étant suivies, si souhaité, d'un traitement avec un hydroxyde métallique afin d'obtenir un disaccharide comportant un groupe carboxylate en position 6  
5 du motif glucuronique, avantageusement avec de la soude pour former un groupe  $\text{-COONa}$ .

Fig.1.

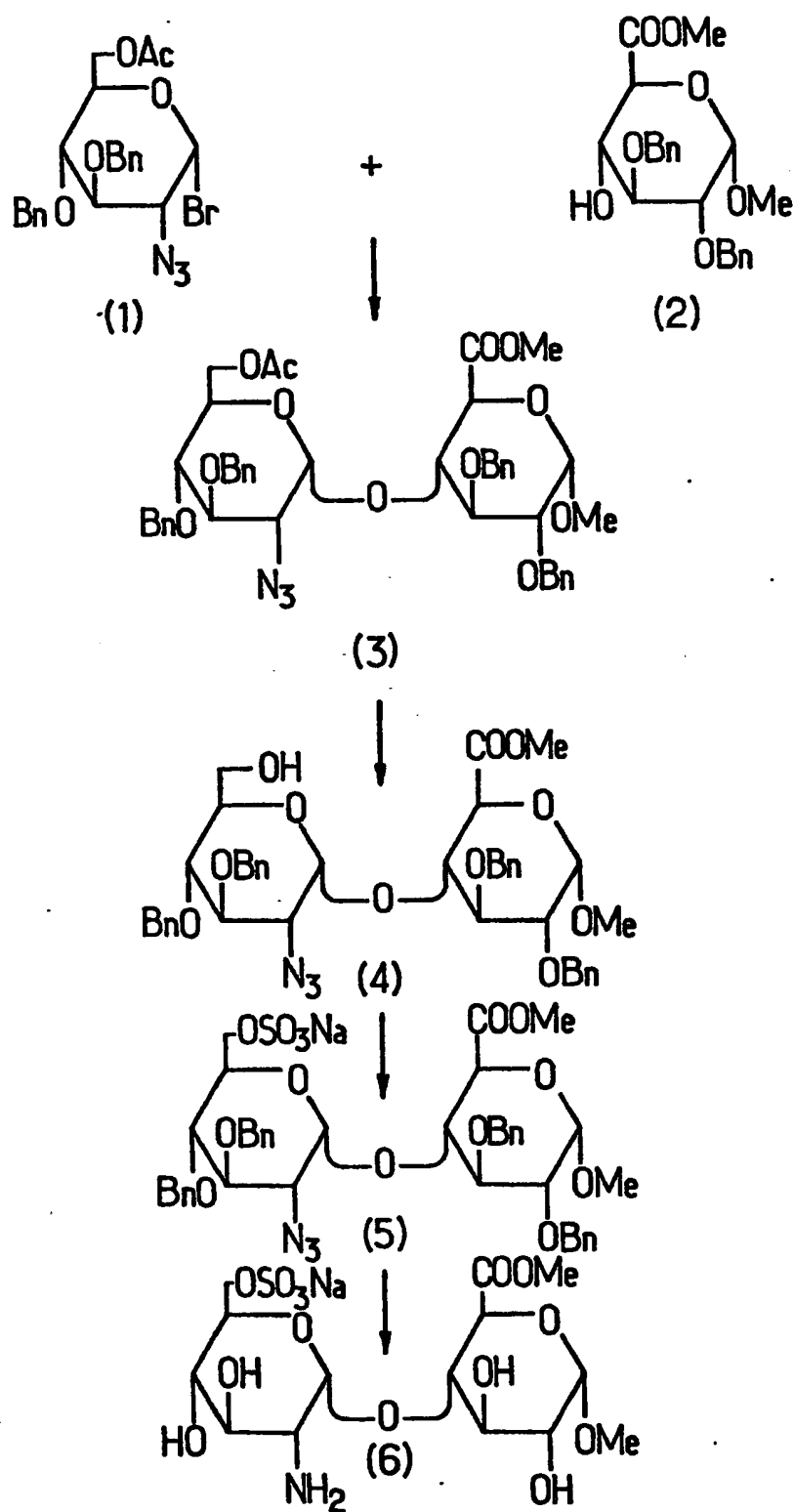




Fig.2.

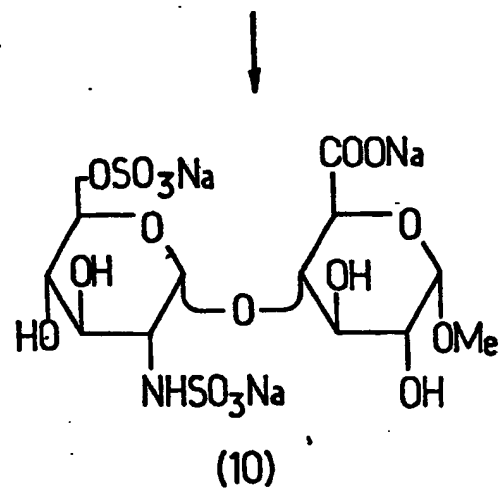
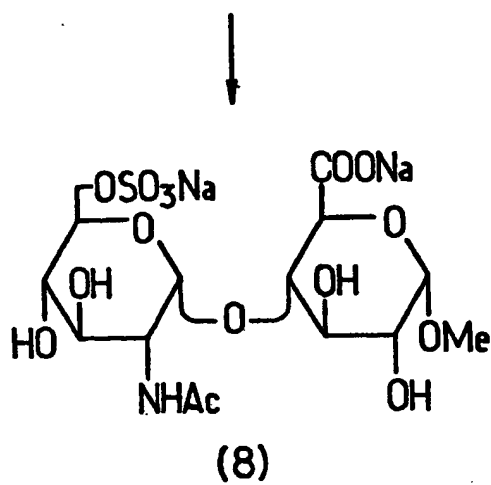
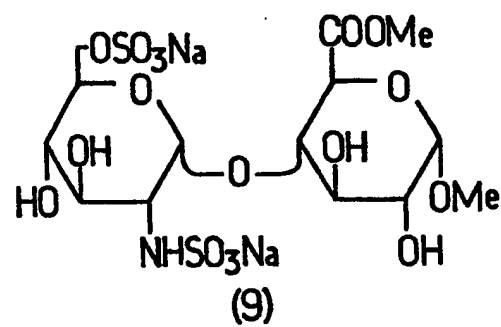
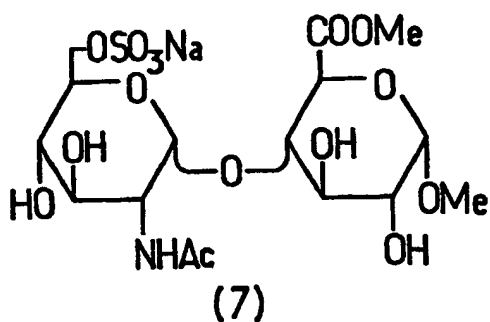
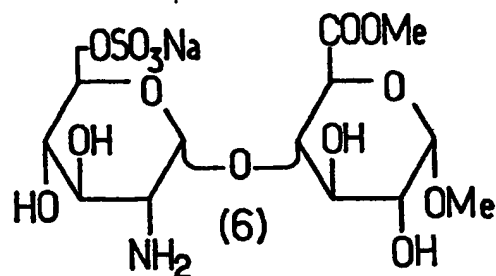


Fig.3.

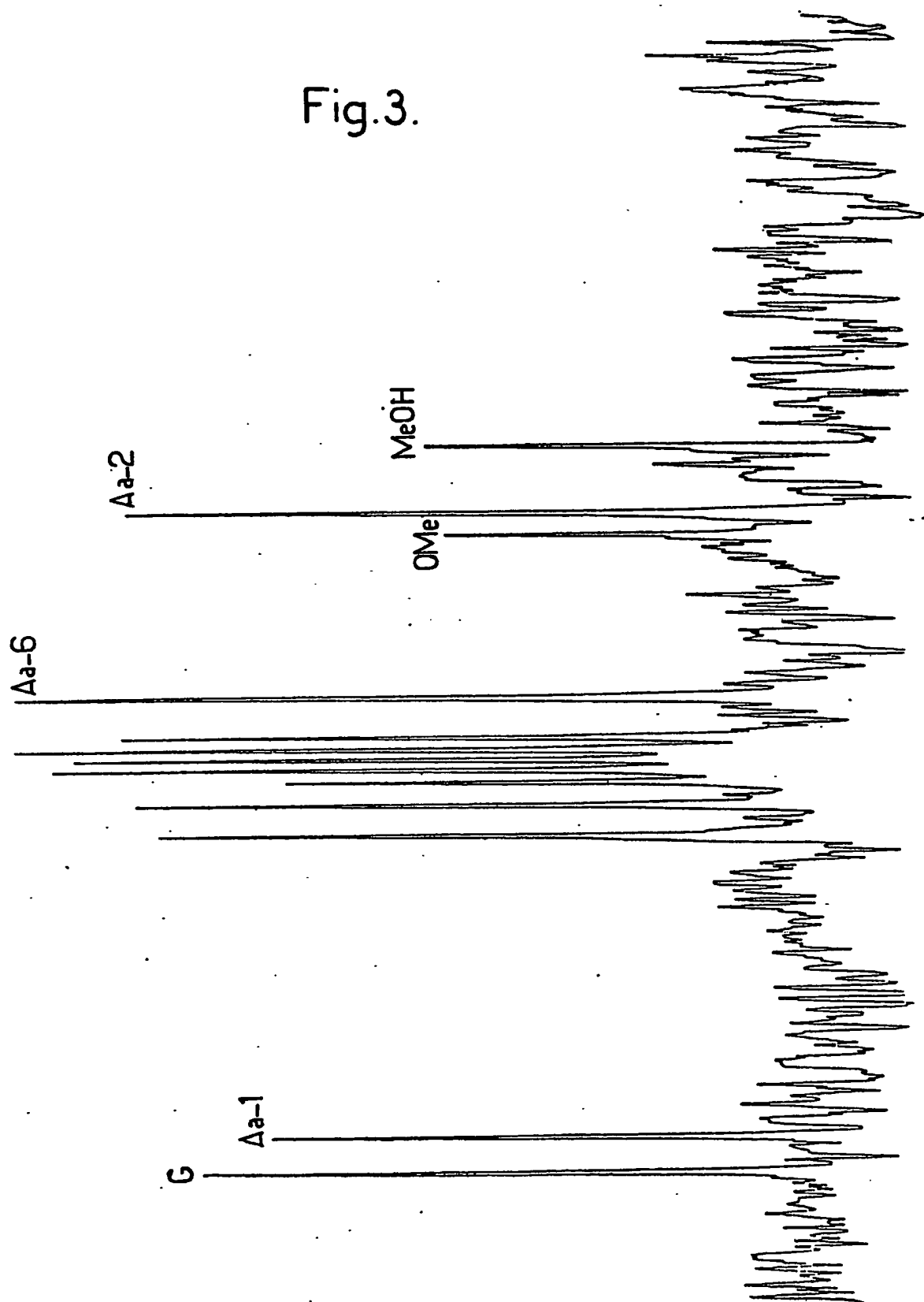
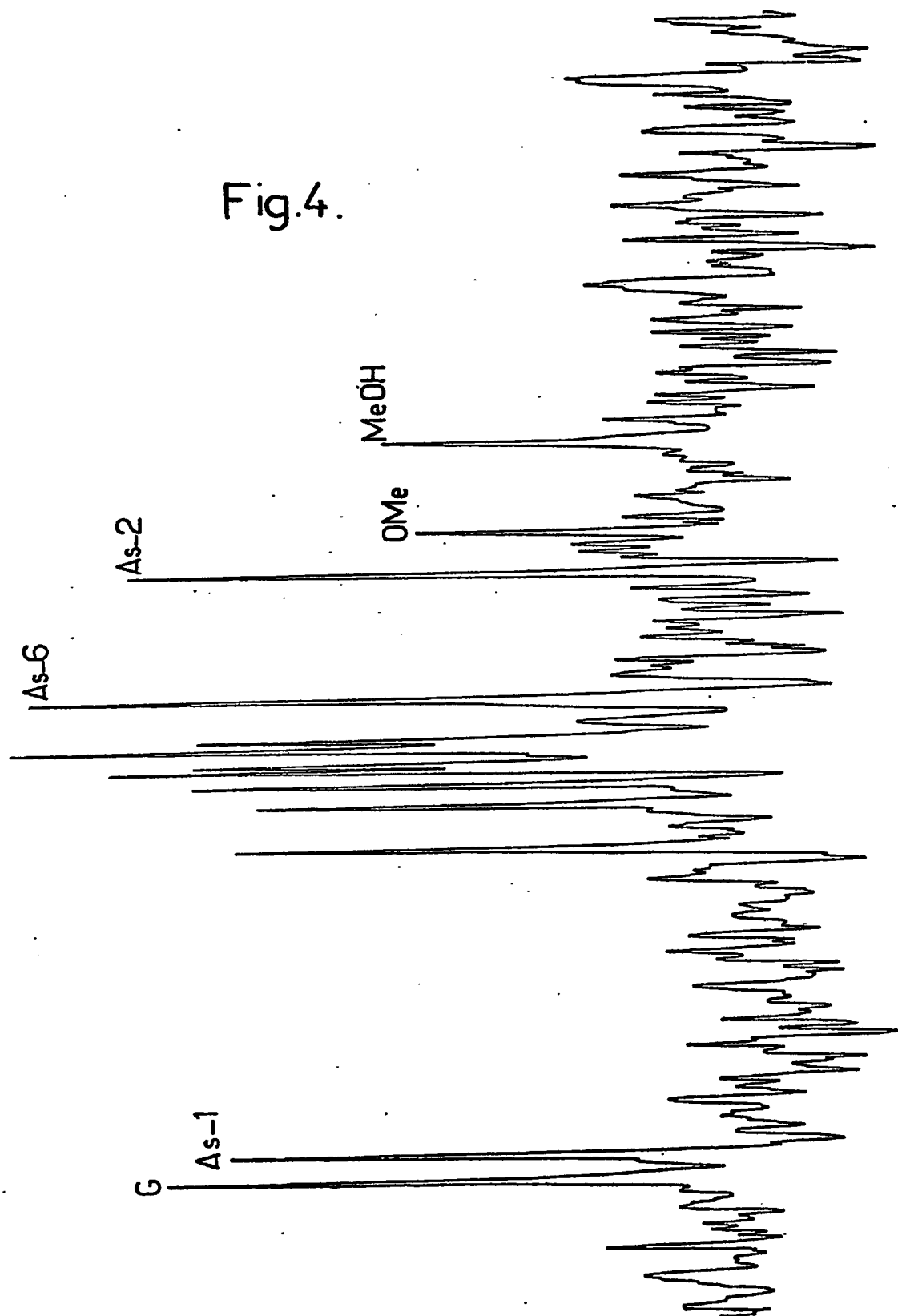


Fig.4.





Office européen  
des brevets

# RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

0064012

Numéro de la demande

EP 82 40 0770

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS  |  |   |  |
|--|--|---|--|
| Catégorie  | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes  | Revendication concernée                         | CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl. 3)  |
| X  | CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 55, no. 26, 25 décembre 1961, colonne 27533d-e<br>COLUMBUS OHIO (US)<br>& Bull. soc. chim. biol. 42, 1799-803.<br>S.A. BARKER et al.: "Some enzyme transfer reactions involving 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose".<br><br>* résumé *                                       | 1,2,3   | C 07 H 15/04<br>C 07 H 15/20<br>A 61 K 31/70//<br>C 07 H 11/00<br>C 07 H 3/04                                  |
| Y  | CARBOHYDRATE RESEARCH, vol. 78, 1980,<br>Elsevier Scientific Publishing Company, AMSTERDAM (NL)<br>U. KLEIN et al.: "A 3H-labelled trisaccharide from heparin as substrate for acetyl-CoA: 2-amino-2-deoxy- $\alpha$ -D-glucoside n-acetyl-transferase", pages 249-256.<br><br>* pages 249-250 * | 1-13  | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl. 3)<br><br>C 07 H 15/00<br>C 07 H 3/00<br>C 07 H 11/00<br>A 61 K 31/00 |
| Y  | EP - A - 0 014 184 (KABI AB)<br><br>* pages 8-9 *  | 1-13  |  |
| Y  | EP - A - 0 027 089 (CHOAY)<br><br>* pages 38-40 *  | 1-13  |  |
| Le présent rapport de recherche a été établi pour toutes les revendications  |  |   |  |
| Lieu de la recherche<br>La Haye  |  | Date d'achèvement de la recherche<br>21-06-1982 | Examineur<br>VERHULST  |
| <b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b><br>X : particulièrement pertinent à lui seul<br>Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie<br>A : arrière-plan technologique<br>O : divulgation non-écrite<br>P : document intercalaire<br><br>T : théorie ou principe à la base de l'invention<br>E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date<br>D : cité dans la demande<br>L : cité pour d'autres raisons<br><br>& : membre de la même famille, document correspondant |  |   |  |

OE Form 1503 03 82



Office européen  
des brevets

## RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

0064012

Numéro de la demande

EP 81 40 0770

- 2 -

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS |   |                         | CLASSEMENT DE LA<br>DEMANDE (Int. Cl.)       |
|---------------------------------------|---|-------------------------|--|
| Catégorie                             | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes | Revendication concernée |  |
| P, Y                                  | <u>EP - A - 0 048 231</u> (KABI AB)<br><br>* pages 8,9 *<br><br>-----           | 1-13                    |  |
|                                       |   |                         | DOMAINES TECHNIQUES<br>RECHERCHES (Int. Cl.) |
|                                       |   |                         |  |
|                                       |   |                         |  |